

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert

Untersuchungen über die Technik und Bewertung einer indirekten Hämagglutinationsreaktion zum Antikörpernachweis bei Toxoplasmose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Manfred Goltz
aus Breslau

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen über die Technik und Bewertung einer indirekten Hämagglutinationsreaktion zum Antikörpernachweis bei Toxoplasmose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Manfred Goltz

aus Breslau

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 21.6.1966

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Professor Dr. med. Braun-Falco
Referent: Professor Dr. med. Siegert
Correferent: Dozent Dr. med. Schiff

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert danke ich für die Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse an der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. W. Mannheim für die Anleitung zur experimentellen Arbeit und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>A. Einleitung</u>	1
<u>B. Material und Methoden</u>	3
I. Fixierung und Aufbewahrung der Erythrozyten	3
II. Antigengewinnung	5
III. Durchführung des Hämagglutinationstests	6
<u>C. Ergebnisse</u>	10
I. Untersuchungen zur Methodik	10
a) pH-Abhängigkeit der Antigenbeladung von Erythrozyten	10
b) Ermittlung der Gebrauchsverdünnung des Antigens	10
II. Vergleich der Hämagglutinationsreaktion mit dem Serofarbttest und der Komplementbindungsreaktion	13
a) an 100 Humanseren	13
b) an Seren experimentell infizierter Kaninchen	15
<u>D. Besprechung</u>	19
I. Die technischen Probleme der Hämagglutinationsreaktion auf Toxoplasmose	19
II. Beurteilung der Ergebnisse	21
<u>E. Zusammenfassung</u>	23
<u>F. Literatur</u>	24

A. Einleitung

In der Serodiagnostik der Toxoplasmose sind zwei quantitative Methoden allgemein gebräuchlich, nämlich der Sero-farbstest nach SABIN und FELDMAN (1948) sowie die Komplement-bindungsreaktion (KBR) in verschiedenen Modifikationen.

Der SABIN-FELDMAN-Test (SFT) bleibt wegen der Verwendung infektionsfähiger Parasiten als Antigen und wegen eines relativ großen Aufwandes auf wenige zentrale Untersuchungsstellen beschränkt. Die Reaktion ist, wie zahlreiche Untersuchungen zeigten (z. B. PIEKARSKI und SAATHOFF, 1961), spezifisch.

Man kann im allgemeinen erwarten, daß der Antikörpernachweis im SFT schon in der 1. - 2. Woche nach der Infektion, mit der KBR jedoch erst von der 3. Woche an gelingt. Im SFT werden zudem noch wesentlich höhere Titer als in der KBR erreicht. Antikörper bleiben im SFT über Jahre, vielleicht lebenslang, nachweisbar, während die komplementbindenden Antikörper bereits im Verlauf von Monaten bis Jahren aus dem Serum unter die Nachweisbarkeitsgrenze verschwinden.

Es war naheliegend, nach einfacheren, nicht mit Infektionsgefahr verbundenen Antikörper-Nachweismethoden zu suchen, um den SFT ersetzen zu können. JACOBS und LUNDE (1957) führten einen Hämagglutinationstest (HAT) ein, in welchem, gemäß der von BOYDEN (1951) angegebenen Technik, tannin-behandelte und mit Toxoplasmaantigen sensibilisierte Erythrozyten verwendet werden.

Sie fanden eine qualitative Übereinstimmung mit dem SFT in 95 % der Fälle. Später stellten sie bei der Untersuchung eines größeren Personenkreises - der stark mit Toxoplasmose durchseuchten Bevölkerung Trinidads - sogar eine 100%ige Übereinstimmung zwischen beiden Reaktionen fest (LUNDE und JACOBS 1958). Diese Ergebnisse konnten von REUSS (1961), welcher beim Vergleich von Humanseren eine Konkordanz zwischen SFT und HAT in 93 % der Fälle angibt, weitgehend bestätigt werden.

Andere humanmedizinische Nachuntersucher kamen jedoch zu widersprechenden Ergebnissen. So fanden MITCHELL und GREEN (1960), allerdings mit einer hinsichtlich der Antigenherstellung modifizierten Technik, daß von 55 SFT-positiven Seren 20 im HAT negativ waren und umgekehrt eines von 18 SFT-negativen Seren im HAT positiv reagierte.

THIERMANN et al. (1963) gingen den Titerunterschieden zwischen SFT und HAT nach. Sie erklärten die Abweichungen im Reaktionsausfall damit, daß höhere SFT-Titer vor allem im Frühstadium der Infektion auf ein frühzeitigeres und schnelleres Ansteigen der entsprechenden Antikörper zurückzuführen seien. Umgekehrt sei eine Diskrepanz auch dadurch möglich, daß eine einmal erreichte Titerhöhe im HAT über längere Zeit konstant bleiben könne, während der SFT unter der Einwirkung klinischer Behandlung, in der Gravidität und unter noch unbekannten Einflüssen häufigeren Titer-schwankungen unterliege.

JACOBS und LUNDE (1963) versuchten die Beziehungen zwischen SFT und HAT an experimentell infizierten Ratten zu überprüfen. Es zeigte sich jedoch, daß im Rattenserum Hemmstoffe auftreten können, die den HAT blockieren. Die Ratte ist demnach als Versuchstier für Untersuchungen dieser Art ungeeignet.

Inzwischen beschäftigten sich verschiedene Autoren mit der Methodik des HAT. JACOBS und LUNDE (1957) hatten als Antigen den wässrigen Extrakt eines durch osmotischen Schock gewonnenen Lysats lebender Toxoplasmen benutzt. MITCHELL und GREEN (1960) konnten jedoch auf diesem Weg kein brauchbares Antigen herstellen und schlugen deshalb die Zerstörung der Toxoplasmen durch Ultraschallbehandlung vor.

Auch hinsichtlich der als Antigenträger verwendeten Erythrozyten wurden Modifikationen vorgenommen. MALONEY und KAUFMAN (1960) verwendeten formalinfixierte Humanerythrozyten, welche lyophilisierbar und für lange Zeit haltbar sind. Dieses Verfahren hatte FLICK (1948) im Rahmen der Virus-hämagglutination eingeführt. Wie MALONEY und KAUFMAN (1960) feststellten, lassen sich formalinfixierte, tanninbehandelte und mit dem Toxoplasmenlysat sensibilisierte Erythrozyten

in lyophilisiertem Zustand 2 Monate ohne Aktivitätsverlust lagern.

Die widersprüchlichen Angaben in der Literatur und die Unsicherheit in der Bewertung des HAT auf Toxoplasmose standen bisher seiner allgemeinen diagnostischen Anwendung im Wege. Da die unterschiedlichen Auffassungen der einzelnen Autoren am ehesten auf eine ungenügend definierte Methodik zurückgehen dürften, erschien eine Überprüfung der Technik des HAT auf Toxoplasmose mit dem Ziel wünschenswert, alle Arbeitsgänge in reproduzierbarer Form auszuarbeiten und zu beschreiben. Weiterhin galt unser Interesse dem Titerverlauf im HAT während der verschiedenen Aktivitätsphasen der menschlichen oder tierexperimentellen Toxoplasmose, verglichen mit den Titerbewegungen, welche mit Hilfe der konventionellen Antikörper-Nachweismethoden gefunden werden.

B. Material und Methoden

I. Fixierung und Aufbewahrung der Erythrozyten

Die Präparation der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Schaferythrozyten erfolgte auf folgende Weise:

- a) Frisches Schafblut wurde zu gleichen Teilen mit ALSEVER-Lösung versetzt, in sterile Röhrchen abgefüllt und bis zu der späteren Fixierung bei + 4 ° gelagert.

Zusammensetzung der ALSEVER-Lösung (SCHMIDT, 1959):

Trinatriumcitrat	4,00 g
Zitronensäure	0,25 g
Glucose (wasserfrei)	9,33 g
Natriumchlorid	2,09 g
<u>Aqua dest.</u>	<u>500 ml</u>

hitzesterilisiert (20 Min. bei 120°).

- b) Die Fixierung der Erythrozyten erfolgte nach der von MALONEY und KAUFMAN (1960) angegebenen Methode. Die in ALSEVER-Lösung steril aufbewahrten Schafblutkörperchen wurden dreimal mit dem doppelten Volumen gepufferter 0,85%iger Kochsalzlösung (pH 7,2) gewaschen und anschließend zu 12,5 % in der gleichen gepufferter Kochsalzlösung suspendiert. (100 ml in einem 300ml-Erlenmeyer-Weithalskolben.) Um eine langsame Durchsetzung der Erythrozytensuspension mit der Fixierlösung (s. unten) zu erreichen, kam ein mit 25 ml Fixierlösung gefüllter Dialysierschlauch in die Erythrozytensuspension. Dieses Vorgehen war notwendig, um eine Agglutination der Erythrozyten zu verhindern. Das die Erythrozytensuspension mit dem Dialysierschlauch enthaltende Gefäß wurde für 24 Stunden bei Zimmertemperatur in der Rolltrommel oder im Schüttelapparat in leichter Bewegung gehalten. Nach Entleerung des Dialysierschlauchs in die Suspension ist das Gemisch weitere 2 Tage bei Zimmertemperatur in der Rolltrommel belassen worden. Anschließend wurden die Erythrozyten bei etwa 2000 g abzentrifugiert und 5-mal mit dem gleichen Volumen gepufferter Kochsalzlösung gewaschen.

Zusammensetzung der Fixierlösung (PARK, 1960):

Formaldehyd (38 Vol%)	200 ml
Äthylalkohol abs.	50 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,00 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	16,13 g
<u>Aqua dest.</u>	<u>750 ml</u>

Zusammensetzung der gepufferter Kochsalzlösung
(pH 7,2):

KH_2PO_4 , m/5	9,3 ml
Na_2HPO_4 , m/5	24,0 ml
NaCl	8,5 g
<u>Aqua dest. ad</u>	<u>1000,0 ml</u>

- c) Die fixierten Erythrozyten konnten zu 20 % in gepufferter Kochsalzlösung suspendiert und mit einem Zusatz von Merthiolat 1 : 10.000 länger als 8 Monate bei + 4 ° gelagert werden.

II. Antigengewinnung

Im wesentlichen wurde das von JACOBS und LUNDE (1957) angegebene Verfahren übernommen. Zur Antigengewinnung dienten Toxoplasmen aus für den SABIN-FELDMAN-Test geeigneten Mäuse-Peritonealexsudaten. Wegen der Infektionsgefahr führten wir alle Arbeiten mit lebenden Toxoplasmen unter Glas, mit verschlossenen sterilisierbaren Sicherheitsspritzen (Inhaltera Recofix mit Stahlkolben) und mit verschließbaren Zentrifugenbechern unter systematischem Ausschluß aller Kontaminationsmöglichkeiten aus. Hierzu gehörte auch die sorgfältige Abdeckung kleiner Hautverletzungen an den Händen.

Die Antigengewinnung gliederte sich in folgende Arbeitsgänge:

- a) Ca. 20 g schwere Albinomäuse des Inzucht-Stammes NMRI (Gesellschaft für Versuchstierzucht, Hannover), die sich bei Prüfung von Stichproben im SFT als toxoplasmosefrei erwiesen hatten, wurden mit $1-2 \times 10^6$ Toxoplasmen (Auszählung in der THOMA-Kammer) aus der Peritoneal-Spülflüssigkeit 48 Stunden vorher infizierter Mäuse intraperitoneal beimpft und nach 48 Stunden getötet. Die angegebene Zahl der Toxoplasmen fand sich gewöhnlich in 0,2 - 0,3 ml des mit 4 ml Spülflüssigkeit gewonnenen Exsudats. Die Toxoplasmen des Exsudats wurden durch zwei- bis dreimalige Spülung der Bauchhöhle mit 4 ml einer 0,85%igen sterilen Kochsalzlösung gewonnen.
- b) Nach Zentrifugation des Exsudates (20 Min. bei 2000 g) wuschen wir das Sediment mit dem 50-fachen Volumen einer gepufferten Kochsalzlösung (pH 7,2).
- c) Das aus gewaschenen Erregern und Exsudatzellen bestehende Sediment wurde zum Lysieren der Toxoplasmen mit dem 50-fachen Volumen destillierten Wassers versetzt und bis zu 18 Stunden bei $+ 4^{\circ}$ gehalten.
- d) Das Lysat konnte durch hochtouriges Zentrifugieren - 10.000 g für 20 Min. - in der Kühlzentrifuge bei ca. $+ 4^{\circ}$ von Partikeln befreit, und wenn die Weiterverarbeitung nicht sofort erfolgte, als Rohantigen bei $- 25^{\circ}$ eingefroren werden.

- e) Anschließend lyophilisierten wir das Rohantigen in kleinen Portionen. In der hierfür verwendeten Anlage konnte bei einem Vakuum von 20 - 40 Mikron Hg in 8 Stunden Gewichtskonstanz erzielt werden.
- f) Das Trockenantigen wurde mit Aqua dest. versetzt und 12 Stunden bei + 4 ° gehalten, dann, um Isotonie zu erreichen, mit dem gleichen Volumen einer 1,7%igen Kochsalzlösung versetzt und 20 Min. bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte sofort zur Sensibilisierung der Erythrozyten gebraucht oder bei - 25 ° eingefroren werden. Als Gebrauchsdosis diente diejenige Antigenverdünnung (ausgehend von einem Trockengewicht von 1,5mg/ml), die mit bekannten positiven Seren bei negativen Kontrollen den höchsten Titer ergab. Für die vorliegende Untersuchung kamen Antigenverdünnungen zwischen 1 : 100 und 1 : 300 (entspricht etwa 15 µg/ml bzw. 5 µg/ml) zur Anwendung.

III. Durchführung des Hämagglutinationstests

Die Ausführung des Hämagglutinationstests folgte der von BOYDEN (1951) angegebenen Technik unter Verwendung tannin-behandelter Schafererythrozyten, die jedoch nach dem oben beschriebenen Verfahren vor der Tanninbehandlung fixiert worden waren. Im einzelnen ergaben sich folgende Schritte:

- a) Die bei + 4 ° gelagerten fixierten Schafererythrozyten mußten 2-mal mit dem gleichen Volumen gepufferter Kochsalzlösung zentrifugiert (2000 g) und zu 2,5 % in der gleichen Kochsalzlösung suspendiert werden.
- b) Die Tanninbehandlung der fixierten Erythrozyten erfolgte auf folgende Weise: Ausgehend von einer bei + 4 ° gelagerten 1%igen Tannin-Stammlösung wurde eine auf 1 : 20.000 verdünnte Lösung hergestellt, die frisch zubereitet zur Anwendung kommen muß. Zu einem Volumen Tannin (1 : 20.000) gaben wir das gleiche Volumen Erythrozytensuspension hinzu. Das Gemisch blieb 30 Min. bei

37 ° im Wasserbad. Danach zentrifugierten wir die Erythrozyten, wuschen einmal mit 2 Volumen gepufferter Kochsalzlösung (10 Min. bei 2000 g) und resuspendierten die Blutkörperchen zu 2,5 % in gepufferter Kochsalzlösung.

- c) Die tannierten Erythrozyten wurden nunmehr mit der vorher ermittelten Antigen-Gebrauchsverdünnung sensibilisiert, die kurz vorher aufgetaut worden war. Zu einem Volumen tannierter Erythrozyten kamen 4 Volumen einer gepufferter Kochsalzlösung (pH 5,2) und 1 Volumen Antigenextrakt. Diese Mischung blieb 15 Min. bei 37 ° im Wasserbad. Nach Abzentrifugieren und zweimaligem Waschen mit einer Lösung 2%igen Kaninchen-Normalserums in gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) erfolgte die erneute Aufschwemmung der sensibilisierten Erythrozyten zu 2,5 % in 2%igem Kaninchen-Normalserum. Die sensibilisierten Erythrozyten konnten ohne Aktivitätsverlust höchstens 1 - 2 Tage bei +4° gelagert werden. (Bei orientierenden Versuchen, sie in diesem Zustand durch schnelles Einfrieren zu konservieren, ging die Suspensionsstabilität verloren.)
- d) Die zu untersuchenden Seren wurden, bevor die sensibilisierten Erythrozyten hinzugegeben werden konnten, folgendermaßen vorbehandelt: Ihre Inaktivierung erfolgte 20 Min. bei 60 °; das als Verdünnungsflüssigkeit für die zu untersuchenden Seren (und für die sensibilisierten Erythrozyten) dienende Kaninchen-Normalserum wurde 20 Min. auf 65 ° erhitzt. Anschließend erfolgte die Absorption aller Seren mit frischen, gewaschenen und gepackten Schafererythrozyten, um eventuell vorhandene heterologe Antikörper gegen Schafererythrozyten zu binden. CHORDI, WALLS und KAGAN (1964) sahen bei ihrem Material in 7,6 % der Fälle unspezifisch positive Reaktionen im HAT durch Antikörper gegen frische Hammelerythrozyten. Zu einem Volumen Serum kam das gleiche Volumen gepackter Erythrozyten hinzu. Die Suspension wurde 3 Std. bei Zimmertemperatur unter langsamer Rotation (1 U/10 Min.) gehalten, und das Serum durch Zentrifugieren abgetrennt.

e) Nun konnten die Serumverdünnungen auf Plexiglasplatten (Prestware Ltd., London, mit 80 kalottenförmigen Vertiefungen von 16 x 11 mm) in 2%igem Kaninchen-Normalserum pipettiert werden.

Wie im SFT wurden Verdünnungsreihen: 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64 usw. hergestellt; das Einzelvolumen betrug 0,4 ml. Anschließend kam zu jedem Ansatz 0,05 bzw. 0,1 ml der 2,5%igen Suspension sensibilisierter Erythrozyten hinzu.

Folgende Kontrollen erwiesen sich als notwendig:

1. Serumkontrolle: Serumverdünnung 1 : 4 + tannierte Hammelerythrozyten.
2. Positives Serum mit bekanntem Titer
3. Negative Serumkontrolle
4. Erythrozyten-Kontrolle (Verdünnungsflüssigkeit + tannierte Erythrozyten)
5. Verdünnungsflüssigkeit + sensibilisierte Erythrozyten.

f) Im Anschluß an das Zutropfen der sensibilisierten Erythrozyten brachten wir das Hämagglutinationstablett 2 Std. in eine feuchte Kammer von 37 °. Anschließend blieb die Platte abgedeckt bei Zimmertemperatur stehen. Die Ablesung erfolgte, wenn die negativen Kontrollen ein kuppenförmiges Sediment bzw. einen kleinen Ring zeigten. Bei Bestimmung des Endtiters wurde als positiv ein flächenhaftes Sediment, bzw. eine Ringbildung von +++ bis + betrachtet und als negativ ein punktförmiges Sediment, bzw. ein kleiner Ring am Boden der Plattenvertiefung. Der Test ist nur bei negativem Ausfall der Serumkontrollen verwertbar (Abb. I).

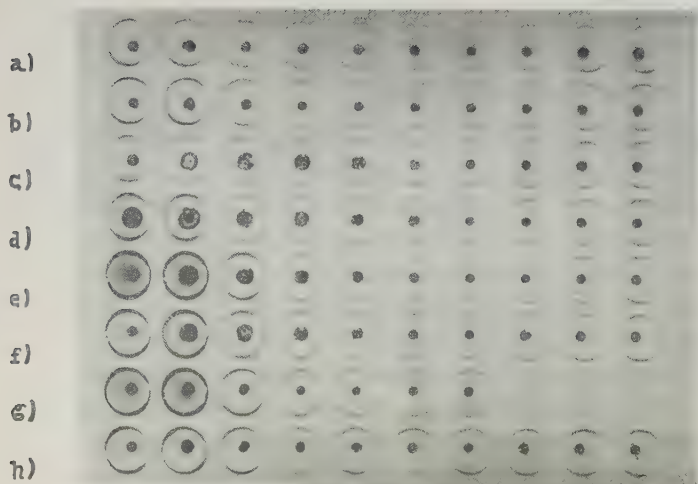


Abb. I: Hämagglutinationstest auf Toxoplasmoseantikörper, ausgeführt auf einem Prestware-Hämagglutinationstablett.

Ablesung nach 2-stündiger Bebrütung bei 37 ° und 12-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur.

Die waagerechten Reihen stellen die Verdünnungsstufen der einzelnen Seren dar. Die erste senkrechte Reihe zeigt die entsprechenden Serumkontrollen (jeweils die niedrigste Verdünnungsstufe des Serums mit tannierte Erythrozyten). Die Seren a), b), g) und h) sind negativ. Serum c) zeigt einen Titer von 1 : 256, Serum d) ist wegen unspezifischer Agglutination nicht zu verwerten. Die Seren e) und f) zeigen einen Titer von 1 : 64. - Außer den gezeigten Serumkontrollen gehören zu jedem Test Erythrozytenkontrollen (tannierte und sensibilisierte Erythrozyten in der Verdünnungsflüssigkeit).

C. Ergebnisse

I. Untersuchungen zur Methodik

a) pH-Abhängigkeit der Antigenbeladung von Erythrozyten

Unsere Vorversuche hatten gezeigt, daß die Bindung von Antigen an die Erythrozytenoberfläche vom pH abhängig ist. Wurde die Sensibilisierung in Phosphat-Pufferlösungen nach SÖRENSEN durchgeführt, deren pH-Wert zwischen 5,2 und 8,0 abgestuft war, so traten beim gleichen Serum Titerunterschiede von mehreren Verdünnungsstufen auf. Die Abb. II zeigt die Abhängigkeit des Hämagglutinations-Titers eines Serums vom pH der Sensibilisierung bei 3 verschiedenen Antigenkonzentrationen. Der höchste Titer fand sich jeweils mit der bei pH 5,2 sensibilisierten Erythrozytencharge. Dieser pH-Wert wurde deshalb zur Sensibilisierung bei allen weiteren Untersuchungen benutzt.

b) Ermittlung der Gebrauchsverdünnung des Antigens

In Tab. 1 wird ein typisches Versuchsprotokoll wiedergegeben, welches die Titerhöhe eines positiven Serums in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration zeigt.

Eine solche Vorprüfung wurde mit jeder neuen Antigencharge durchgeführt, um die Antigen-Gebrauchsverdünnung zu finden, die mit einem positiven Serum den höchsten Titer bei negativen Kontrollen ergibt.

Das verwendete Serum hatte einen SFT-Titer von 1 : 4000 und zeigte bei einer Antigenverdünnung von 1 : 100 (das entspricht ca. 15 µg Trockengewicht/ml) im HAT ebenfalls einen Titer von 1 : 4000. Bei einer Antigenverdünnung von 1 : 300 (5 µg/ml) waren Antikörper im HAT dagegen nicht nachweisbar (vgl. Tab. 1). Aus Tab. 1 geht hervor, daß Testsuspensionen einer reproduzierbaren Empfindlichkeit nur bei Verwendung eines Vergleichsserums erwartet werden können.

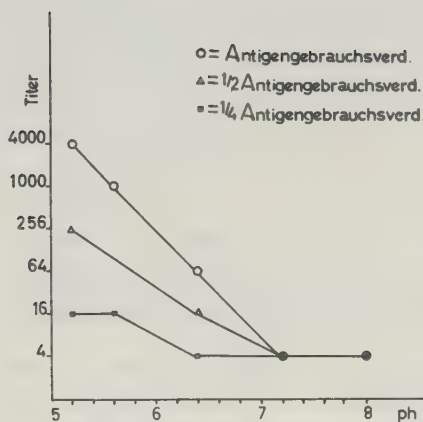


Abb. II: Abhängigkeit des Hämagglutinationstiters
eines Serums vom pH der Sensibilisierung.

Serumverdünnungen
1:2

Antigen- verdün- ung	Kontrolle (sens. Erythr. ohne Serum)	4	16	64	256	1000	4000	16000	64000	256000	Titer
1:50	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-
1:100	Ø	+	+++	+++	++	++	++	Ø	Ø	Ø	1:4000
1:150	Ø	+	++	++	++	++	Ø	Ø	Ø	Ø	1:1000
1:300	Ø	Ø	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tab. 1: Antikörpertiter eines Serums in Ab-
hängigkeit von der Antigenkonzentration.

Bei einer Antigenverdünnung von 1 : 50 agglu-
tinierten die sensibilisierten Erythrozyten
bereits in der Verdünnungsflüssigkeit ohne
Serumzusatz. Bei einer Verdünnung von 1 : 100
konnte bei negativer Kontrolle ein Titer von
1 : 4000 abgelesen werden. Sie diente als Ge-
brauchsverdünnung für weitere Reaktionen. Zur
Gewährleistung einer reproduzierbaren Empfind-
lichkeit ist die Verwendung eines Vergleichs-
serums von bekanntem Titer erforderlich.

II. Vergleich der Hämagglutinationsreaktion mit dem Serofarbstest und der Komplementbindungsreaktion

a) an 100 Humansenen

Der HAT wurde mit dem SFT und der KBR an 100 Humansenen verglichen, die willkürlich aus dem Untersuchungsamt des diagnostischen Laboratoriums ausgewählt worden waren. Die Seren hatten bis zu ihrer Untersuchung bei $- 25^{\circ}$ gelagert. Die Titer der einzelnen Tests sind in Tab. 2 gegenübergestellt.

Qualitativ bestand die folgende Beziehung zwischen den Resultaten des SFT und HAT: von 31 im SFT negativen Seren waren 25 auch im HAT negativ, 4 Seren zeigten im HAT einen Titer von 1 : 16 und 2 Seren einen Titer von 1 : 64. Von 69 im SFT positiven Seren waren 58 auch im HAT positiv, die übrigen negativ.

Quantitativ ergaben sich beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Reaktionen: von 15 Seren, die im SFT einen übereinstimmenden Titer von 1 : 1000 aufwiesen, war im HAT 1 Serum negativ, 4 Seren zeigten einen Titer von 1 : 16 und 2 Seren einen Titer von 1 : 64, 5 Seren erreichten einen Titer von 1 : 256 und 3 Seren 1 : 1000. In ähnlicher Weise streuten auch die Titer der anderen Seren im HAT um 6 Verdünnungsstufen, bezogen auf den gemeinsamen SFT-Titer.

Von den untersuchten Serumproben waren 19 in der KBR positiv, 1 Serum konnte wegen Eigenhemmung nicht beurteilt werden. Während die SFT-Titer im allgemeinen höher als im HAT lagen, waren die der KBR niedriger; wenn man jedoch beim Titervergleich berücksichtigt, daß im HAT (ebenso wie im SFT) Serumendverdünnungen, in der KBR jedoch Anfangsverdünnungen angegeben werden, entspricht die maximale Titerhöhe der KBR weitgehend derjenigen des HAT. Die KBR verhält sich zum HAT ähnlich wie zum SFT, d.h. bei höheren HAT-Titern (größer als 1 : 256) nimmt die Zahl der positiven Reaktionen zu.

Bei einzelnen Seren trat ein Prozonephänomen ähnlich wie im SFT auf, so daß die ersten Verdünnungsstufen negativ erschienen. Auch REUSS (1961) berichtete bereits über diese Erscheinung.

Anzahl der Se- ren	SPT Titer 1:2	Davon im VAT							Davon in der KBR							Eigen- hemmung
		β	4	16	64	256	1000	4000	16000	β	5	10	20	40	80	
31	β	25	-	4	2	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-	-
1	4	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
4	16	2	-	-	1	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
12	64	2	-	4	1	1	4	-	-	10	1	-	-	-	-	1
27	256	3	-	6	3	10	5	-	-	21	5	1	-	-	-	-
15	1000	1	-	4	2	5	3	-	-	9	4	2	-	-	-	-
4	4000	1	-	1	-	1	1	-	-	2	-	1	-	1	-	-
4	16000	1	-	1	1	-	-	1	-	2	-	1	1	-	-	-
2	64000	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-

Tab. 2: Titervergleich bei 100 willkürlich
ausgewählten Humanseren im SABIN-FELDMAN-Test,
im Hämagglutinationstest und in der Komplement-
bindungsreaktion.

Wir fanden in 5 von 100 Fällen eine unspezifische Agglutination der Erythrozyten durch Humansenen, obwohl diese mit Schafblutkörperchen vorher absorbiert worden waren. Die Ursache der unspezifischen Agglutination wurde nicht geklärt.

Als serologisch verdächtig bei einmaliger Untersuchung gelten SFT-Titer von 1 : 1000 bei gleichzeitigen KBR-Titern von 1 : 10 und höher, besonders wenn klinische Aktivitätszeichen vorhanden sind. Aber auch nach Abklingen der Toxoplasmose können erfahrungsgemäß hohe Antikörpertiter lange persistieren. Erst der Nachweis eines deutlichen Titeranstiegs von mindestens 2 Stufen bei 2 im Abstand von 1 - 2 Wochen entnommenen Serumproben kann als beweisend für einen aktiven Prozeß betrachtet werden.

Falls mit den 3 Reaktionen qualitativ verschiedenartige Antikörper nachgewiesen werden, besteht die Möglichkeit eines in Bezug auf die Aktivität unterschiedlichen Verlaufs der Titerkurven. Es wäre dann beim Vergleich von Einzeluntersuchungen aus verschiedenen Krankheitsstadien eine Übereinstimmung der Titer in den 3 Reaktionen nicht zu erwarten.

Versuche, die im HAT aktiven Antikörper mit sensibilisierten Erythrozyten erschöpfend zu absorbieren, um die Qualität der verbleibenden Antikörper prüfen zu können, schlugen offenbar infolge der geringen Menge des an die Blutkörperchen adsorbierten Antigens fehl (vgl. die entsprechenden Ergebnisse von CHORDI et al. 1964).

b) Vergleich der 3 Reaktionen an Seren experimentell infizierter Kaninchen

Um die Bedeutung des HAT für die Aktivitätsdiagnose einer Toxoplasmose kennenzulernen, versuchten wir, die Beziehung der Reaktionen zueinander am Beispiel einer experimentellen Infektion zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden 5 Kaninchen verschiedener Herkunft mit Toxoplasmen des wenig virulenten GAIL-Stammes (welcher uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. PIEKARSKI, Bonn, überlassen worden war) durch subkutane Injektion cystenhaltigen Mäusehirns beimpft.

Zwei Tiere starben innerhalb einer Woche nach der Infektion, eines davon infolge generalisierter Toxoplasmose, bei dem anderen Tier konnte die Todesursache nicht geklärt werden. Ein drittes Tier starb nach 26 Tagen an einer interkurrenten Infektion. Zwei Kaninchen überlebten 12 Monate, eines davon starb nach 12,5 Monaten an einer Pasteurellose. Das letzte Tier wurde nach 15 Monaten getötet. Hiervon wurden Organproben mikroskopisch auf das Vorhandensein von Cysten untersucht sowie Hirn- und Lebersuspensionen auf SFT-negative Mäuse überimpft; mikroskopisch konnten in keiner der Organproben Cysten nachgewiesen werden; bei allen mit der Hirnsuspension infizierten Mäusen stellten wir jedoch nach 14 Tagen Antikörper im SFT fest. Die Titer der Tiere lagen zwischen 1 : 64 und 1 : 1000. Die mit der Lebersuspension beimpften Mäuse hingegen zeigten nach 6 Wochen im SFT keine positiven Reaktionen.

Der Titerverlauf der 3 Reaktionen nahm folgende Entwicklung (Abb. III, IV, V). Alle Seren zeigten zunächst einen positiven SFT, der sehr frühzeitig, nämlich bereits um den 5. - 10. Tag die Grenze der Nachweisbarkeit überschritt, um dann innerhalb von etwa 12 Tagen auf Werte von 1 : 64.000 - 1 : 1.000.000 anzusteigen.

Zwischen dem 7. - 11. Tag p.i. erschienen Antikörper im HAT, die etwa 14 Tage p.i. ein Titermaximum von 1 : 1.000 erreichten.

In der KBR fanden sich erst zwischen dem 12. - 15. Tag p.i. positive Reaktionen, nach 23 - 26 Tagen p.i. wurden die höchsten Werte bei 1 : 320 bzw. 1 : 640 abgelesen.

Der weitere Verlauf über 12 Monate zeigte in keinem der 3 Untersuchungsverfahren einen deutlichen Titerabfall. Der SFT wies konstant hohe Titer auf, sie lagen bei 1 : 64.000. Schwankungen um eine Titerstufe liegen innerhalb der Fehlerbreite der Methode. Im HAT blieben gleichfalls die einmal erreichten Titer bei geringen, methodisch bedingten Schwankungen bestehen. Was für diese beiden Reaktionen gesagt wurde, gilt auch für die KBR. Hier lagen die Titer bei 1 : 320 bzw. 1 : 160.

Legenden zu den Abbildungen III, IV und V:

Titerverlauf im SABIN-FELDMAN-Test, im Hämagglutinations-
test und in der Komplementbindungsreaktion bei 3 experi-
mentell infizierten Kaninchen.

Im HAT sind später als im SFT, aber früher als in der KBR Antikörper nachweisbar; der HAT nimmt hinsichtlich Empfindlichkeit und Titerhöhe eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen Reaktionen ein.

In Abb. III: das Tier starb am 26. Tag p.i. interkurrent.

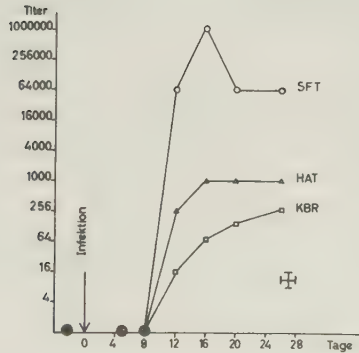


Abb. III

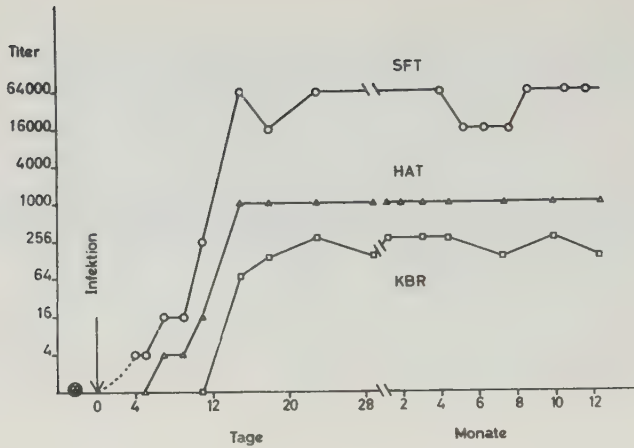


Abb. IV

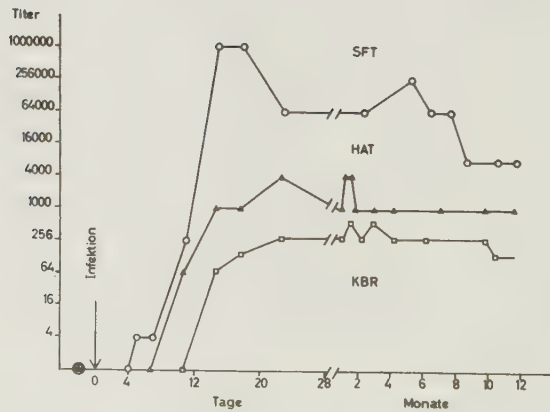


Abb. V

Da die Kaninchen bei der Infektion auch kleine Mengen Mäusehirn erhalten hatten, mußte eine Störung des spezifischen HAT durch Reaktion der Kaninchen-Antiseren mit Mäuseprotein ausgeschlossen werden. Deshalb wurden einige dieser Seren mittels des HAT auf unspezifische Antikörper gegen Mäuseprotein untersucht. Zu diesem Zweck sensibilisierten wir tannierte Erythrozyten einmal mit einem Extrakt der Peritoneal-Spülflüssigkeit einer normalen Maus, die mikroskopisch Zellen enthielt. Sie wurde der Antigenpräparation analog behandelt. Zum anderen sind Erythrozyten mit dem Extrakt einer Mäusehirnsuspension, die ebenfalls wie das Antigen behandelt worden war, sensibilisiert worden.

Die mit der Spülflüssigkeit sensibilisierten Blutkörperchen wurden von keinem Kaninchenserum verklumpt. Dagegen agglutinierten die mit dem Mäusehirnextrakt behandelten Erythrozyten bereits spontan, so daß sie nicht verwertet werden konnten.

D. Besprechung

=====

I. Die technischen Probleme der Hämagglutinationsreaktion auf Toxoplasmose

In der Serodiagnostik der Toxoplasmose spielt der SFT weiterhin die Hauptrolle, er wird in den meisten Laboratorien mit der KBR kombiniert. Da infektionstüchtige lebende Toxoplasmen benötigt werden und er relativ aufwendig ist, kann der SFT nur an wenigen zentralen Untersuchungsstellen ausgeführt werden. Der von JACOBS und LUNDE (1957) angegebene HAT fand zahlreiche Nachuntersucher wegen der Möglichkeit, eine Serodiagnostik der Toxoplasmose auch in kleineren Laboratorien zu betreiben. Die Voraussetzungen hierfür sind: ausreichende Empfindlichkeit und Spezifität der Methode, einfach durchzuführende Technik und Reproduzierbarkeit.

Alle Nachuntersucher bezeichnen den HAT als eine empfindliche Methode zum Antikörpernachweis, die der Empfindlichkeit des SFT nur wenig nachsteht.

Die Diskussion über die Technik des HAT ist auch heute noch nicht verstummt. Es sind im wesentlichen zwei Fragen, die der Klärung bedürfen. Auf der einen Seite ist es die Standardisierung der Antigenträger und auf der anderen die des Antigens selbst.

Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, sind diese Probleme prinzipiell durchaus lösbar. Die Konservierung von Erythrozyten mit einem Formaldehyd-Aethanol-Gemisch (MALONEY und KAUFMAN, 1960; PARK, 1961) stellt insofern einen Vorteil dar, als sie länger als 8 Monate ohne Veränderungen gelagert werden können und nicht die pH- und osmotische Empfindlichkeit frischer Erythrozyten aufweisen.

Beachtung verdient die von uns nicht näher untersuchte Technik von MALONEY und KAUFMAN (1960), die fixierte, tanninbehandelte und sensibilisierte Erythrozyten bei -15° gefroren lagern und ohne Verlust der Suspensionsstabilität lyophilisieren konnten.

Die Hauptschwierigkeit in der Durchführung des HAT liegt unseres Erachtens in der Präparation sicher vergleichbarer Antigenlösungen. Fortschritte wären durch Fraktionierung des Antigens und Reinigung der antigen wirksamen Substanzen zu erwarten.

Wir fanden in Übereinstimmung mit REUSS (1961), daß die Sensibilisierung mit konzentrierten Antigenlösungen eine große Neigung zur Spontanagglutination der Erythrozyten zur Folge hat. Es ist daher anzunehmen, daß die Anwesenheit von Zellproteinen, möglicherweise auch aus dem Mäuse-Peritonealexsudat, den Test beeinflusst. Da der Zellgehalt des Peritonealexsudates starken Schwankungen unterliegt und von den zur Antigengewinnung verarbeiteten Toxoplasmen nicht abgetrennt werden kann, ist dieser Faktor bei Verwendung ungereinigter Extrakte des Exsudatsediments als Antigen schwer zu beeinflussen, am ehesten wohl durch die industrielle Herstellung großer Antigenchargen.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im HAT ist gut, wenn mit hinreichenden Kontrollen gearbeitet wird.

Außer der erwähnten Konservierung der Erythrozyten dürften die folgenden Modifikationen der Methode von JACOBS und LUNDE (1957) vorteilhaft sein:

- 1) die Sensibilisierung bei pH 5,2 , da hierbei ein geringer Antigenverbrauch zu erwarten ist;
- 2) die Angabe der Antigenkonzentration in Trockensubstanz des lyophilisierten Toxoplasmenlysats/ml, um eine konstante Bezugsgröße zu haben.

II. Beurteilung der Ergebnisse

JACOBS und LUNDE (1957) gaben eine qualitative Übereinstimmung von SFT und HAT in über 95 % der Fälle an. REUSS (1961) kam zu einem ähnlichen Ergebnis, nämlich 93,1 %. MITCHELL und GREEN (1960) berichteten, daß von 55 SFT-positiven Seren 20 im HAT negativ waren und umgekehrt von 18 SFT-negativen Seren 1 Serum im HAT positiv reagierte. Bei CHORDI et al. (1964) verhielten sich unter 320 SFT-positiven Seren nur 7 im HAT negativ und von 700 SFT-negativen Proben waren 197 im HAT positiv. WITMER et al. (1961) fanden bei einem Material von 40 Seren 5 SFT-negative Seren mit einem positiven HAT und 7 SFT-positive Seren mit einem negativen HAT. An Hand unserer Ergebnisse läßt sich die von JACOBS und LUNDE bzw. von REUSS angegebene sehr weitgehende qualitative Übereinstimmung zwischen SFT und HAT nicht bestätigen.

Was die quantitative Beziehung der Reaktionsausfälle zueinander betrifft, so kann keine Parallelität festgestellt werden. Es wäre noch zu untersuchen, ob bei den HAT-negativen Humansenen mit hohen SFT-Titern Inhibitoren der Hämagglutinationsreaktion auftreten, wie sie JACOBS und LUNDE (1963) bei Ratten nachweisen konnten.

CHORDI et al. (1964) prüften die Spezifität der positiven HAT-Reaktionen und konnten bei Seren, deren Titer 1 : 200 oder tiefer lagen, eine Titerreduktion durch Absorption mit unspezifischen Antigenen (Hammelblutkörperchen, Mäuseserum, Mäuseleukozyten) erreichen. Bei Seren, deren Titer höher als 1 : 200 waren, gelang eine Titerreduktion nur bei Absorption mit spezifischem Toxoplasmaantigen.

Beim experimentell infizierten Kaninchen ergab der Titerverlauf des SFT, HAT und der KBR insofern eine große Übereinstimmung, als hier die einzelnen Titer einem bestimmten Stadium des Krankheitsprozesses zugeordnet werden können. Bei dem willkürlich entnommenen Material des diagnostischen Laboratoriums verfügten wir in der Regel nur über 2 Blutproben eines Patienten.

Der HAT ergibt 3 - 4 Tage später als der SFT, aber früher als die KBR positive Resultate. Die mit den 3 Reaktionen erreichten Antikörpertiter blieben während der Beobachtungszeit von 12 Monaten konstant. Aus den Titerverläufen geht hervor, daß der HAT eine Mittelstellung der Empfindlichkeit zwischen dem SFT und der KBR einnimmt. Leider können Angaben über den Titerabfall nicht gemacht werden, da er in der Beobachtungszeit von über einem Jahr nicht eingetreten ist. Wahrscheinlich beruht diese Titerpersistenz auf einer Antigenpersistenz durch die überlebenden Cysten. Die Tatsache, daß die Mäuse, die mit der Hirnsuspension eines 15 Monate p.i. getöteten Kaninchens beimpft worden waren, spezifische, im SFT nachgewiesene Antikörper bildeten, spricht für diese Annahme.

Die Ergebnisse der oben gezeigten Titerverlaufskurven wurden an experimentell mit relativ hohen Dosen infizierten Versuchstieren gewonnen. Der zur Infektion benutzte GAIL-Stamm ist von dem zum Antikörpernachweis gebrauchten BK-Stamm möglicherweise nicht nur hinsichtlich der Virulenz, sondern auch immunologisch etwas verschieden. Wir halten es jedoch für zulässig, aus den Befunden an Humanseren von anderen Autoren (z.B. THIERMANN et al. 1963) und eigenen Untersuchungen eine Analogie beim Menschen entnehmen zu können.

Nach diesen Untersuchungen darf gesagt werden, daß dem HAT kein zusätzlicher diagnostischer Wert, zumindest nicht für die akute Phase einer Toxoplasmose, zukommt. Die Vorteile dieser Reaktion liegen in ihrer gefahrlosen Verwendbarkeit in jedem Laboratorium, ihrer einfacheren Technik und ihrer relativ hohen Empfindlichkeit. Als eine wesentliche Voraussetzung für die allgemeine Anwendung des indirekten HAT auf Toxoplasmose wäre allerdings die zentrale Herstellung standardisierter, stabiler Antigenpräparate und konservierter Antigenträger wünschenswert.

E. Zusammenfassung

1. Die Methodik des indirekten HAT auf Toxoplasmose nach JACOBS und LUNDE (1957), modifiziert durch Verwendung formalin-fixierter Erythrozyten nach MALONEY und KAUFMAN (1960); sowie PARK (1961) wurde auf reproduzierbare Grundlagen gestellt.
2. Die Antigenadsorption an die Trägererythrozyten bei pH 5,2 und die Beziehung der Antigenkonzentration auf das Trockengewicht des Toxoplasmen-Rohextrakts können als technische Modifikationen empfohlen werden.
3. Die Reaktionen im SFT, HAT und in der KBR wurden an 100 willkürlich ausgewählten Humanseren vergleichend untersucht. Es zeigte sich eine hinreichende qualitative Übereinstimmung zwischen dem SFT und dem HAT. Dagegen bestand keine quantitative Übereinstimmung zwischen beiden Reaktionen: die Titer im HAT streuten um 6 Verdünnungsstufen, bezogen auf einen gemeinsamen SFT-Titer.
4. Die Beziehung zwischen Titerhöhe und Aktivität des Krankheitsprozesses wurde an 3 Kaninchen untersucht. Es zeigte sich, daß im SFT schon 4 - 5 Tage nach der Infektion Antikörper nachweisbar sind und die höchsten Antikörpertiter erreicht werden, während positive Reaktionen im HAT einige Tage später, aber früher als in der KBR auftraten. Die Titerhöhe im HAT lag zwischen dem SFT und der KBR.
5. Während einer Beobachtungszeit der Versuchstiere von 12 Monaten trat bei keiner der 3 Reaktionen ein deutlicher Abfall der einmal erreichten Titer ein. Das Persistieren der Titer konnte auf das Bestehen einer latenten Infektion der Tiere zurückgeführt werden.
6. Der Vorteil des HAT liegt darin, daß dieser Test in kleineren Laboratorien möglich ist, da zu seiner Durchführung keine infektiösen Parasiten nötig sind, die Technik relativ einfach und die Empfindlichkeit nur wenig geringer als die des SFT ist. Voraussetzung für eine breite Anwendung wäre allerdings die zentrale Herstellung standardisierter Antigenchargen und Antigen-träger.

F. Literatur

=====

- BEVERLY, I.K.A.: Congenital toxoplasma infections.
Proc.Roy.Soc.Med. 53, 111-113 (1960).
- BOYDEN, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
J.Exp.Med. 93, 107-120 (1951).
- CHORDI, A., WALLS, K.W. and KAGAN, I.G.: Studies on the specificity of the indirect hemagglutination test for toxoplasmosis.
J. Immunol. 93, 1024-1033 (1964).
- CSIZMAS, L.: Preparation of formalinized erythrocytes.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 103, 157-160 (1960).
- FELDMAN, H.A.: Human toxoplasmosis.
J.chron.Dis. 10, 488-499 (1959).
- FLICK, J.A.: Use of formalin-treated red cells for the study of influenza-A-virus-hemagglutinating activity. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 68, 448-450 (1948).
- JACOBS, L. and LUNDE, M.N.: Hemagglutination test for toxoplasmosis. Science 125, 1035 (1957).
- KNIERIM, F. et al.: The HAT in the serolog. diagnosis of toxoplasmosis. Bol.Chil.Parasit. 15, 48-50 (1960).
- LUDLAM, G.B.: Laboratory diagnosis of toxoplasmosis.
Proc.Roy.Soc.Med. 53, 113-116 (1960).
- LUNDE, M.N. and JACOBS, L.: A comparison of results of hemagglutination and dye-test for toxoplasmosis in a survey of Trinidad natives.
Amer.J.Trop.Med.Hyg. 7, 523-525 (1958).
- LUNDE, M.N. and JACOBS, L.: Toxoplasma hemagglutination and dye-test antibodies in experimentally infected rats. J. Parasit. 49, 932-936 (1963).

- MALONEY, E.D. and KAUFMAN, H.E.: The rapid and convenient detection of toxoplasma antibodies using formaldehyde treated human erythrocytes. *Amer.J.Ophthal.* 50, 945-950 (1960).
- MIDDLEBROOK, G. and DUBOS, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J.Exp.Med.* 88, 521-528 (1948).
- MITCHELL, R.G. and GREEN, C.A.: The hemagglutination test for toxoplasma antibodies. *J.Clin.Path.* 13, 331-335 (1960).
- PARK, H.K.: Toxoplasma hemagglutination test using alcohol-formalin fixed sensitized lyophilized erythrocytes. *Arch.Ophthal.* 65, 184-191 (1961).
- PIEKARSKI, G.: Zur Diagnostik der Toxoplasmose. *Münch.med.Wschr.* 102, 842-846 (1960).
- PIEKARSKI, G. und SAATHOFF, M.: Vergleichende serologische Untersuchungen mit Sarcosporidien- und Toxoplasmaantigen. *Z.Parasit.* 21, 363-368 (1961).
- REUSS, K.: Untersuchungen zur Hämagglutinationsreaktion auf Toxoplasmose nach JACOBS und LUNDE. *Z.Immunit.-forsch.* 121, 75-90 (1961).
- SABIN, A.B.: Complement fixation test in toxoplasmosis and persistence of the antibody in human beings. *Pediatrics* 4, 443-452 (1949).
- SABIN, A.B. and FELDMAN, H.A.: Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). *Science* 108, 660-663 (1948).
- SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie. (Verlag Dr. Steinkopff) Darmstadt (1955).
- SCHMIDT, H.: Die Konglutination, das Komplement. (Verlag Dr. Steinkopff) Darmstadt (1959).
- THALHAMMER, O.: Klinik, serologische Diagnostik und Therapie der Toxoplasmose. *Wien.med.Wschr.* 113, 375-381 (1963).

- THIERMANN, E., KNIERIM, F. und NIEDMANN, G.: Vergleichende Untersuchungen über die SABIN-FELDMAN-Reaktion und den Hämagglutinationstest bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii*. Zbl.Bakt. I Orig. 192, 230-260 (1963).
- WITMER, R., ROTH, W. und FAORO, N.: Die Toxoplasmose-Hämagglutination. Ophthalmologica 141, 402-409 (1961).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten in:

Marburg: Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Bücher,
Dimroth, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann,
Hensel, Heuser, Hornung, Huber, Jacob,
Kessler, Lang, Linneweh, Neubauer, Niessing,
Oksche, Petry, Schiff, Schmid, Schmitz,
Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert,
Stein, Straub, Streicher, Walcher, Wendt,
Würterle;

Kiel: Behrens, Doerr, Hörmann, Portwich, Reinwein,
Seusing, Wanke.

Lebenslauf

Als Sohn des Polizeiinspektors Gustav Goltz und seiner Ehefrau Martha, geb. Fiedler, wurde ich am 4. Dez. 1938 in Breslau geboren. Nach der Flucht aus Schlesien siedelten meine Eltern nach Hannoversch Münden über. Dort bestand ich 1950 die Aufnahmeprüfung am städtischen Gymnasium und legte Ostern 1959 die Reifeprüfung ab. Zum Sommersemester 1959 immatrikulierte ich an der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität in Marburg. Im Oktober 1961 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung. Während des Sommersemesters 1962 studierte ich an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel, ging dann nach Marburg zurück und meldete mich hier nach dem 12. Semester zum Staatsexamen, das ich am 15. Oktober 1965 beendete. Seit dem 1. November 1965 bin ich am Hygiene-Institut der Universität Marburg als Medizinal-Assistent tätig.

Im Dezember 1963 erhielt ich von Herrn Professor Dr. med. R. Siegert das Thema zu meiner Doktorarbeit. Nachdem ich mich mit dem Arbeiten im serologischen Laboratorium vertraut gemacht hatte, begann ich im Frühjahr 1964 mit den Versuchen. Diese wurden durch die Vorbereitungen zum Staatsexamen unterbrochen. Im Januar 1966 konnten die experimentellen Arbeiten abgeschlossen werden.

